

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-89596

(43)公開日 平成11年(1999)4月6日

(51)Int.Cl.⁶
C 1 2 Q 1/68
// C 1 2 N 15/09

識別記号

Z N A

F I

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 N 15/00

A

Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数8 F D (全 11 頁)

(21)出願番号 特願平9-271993

(22)出願日 平成9年(1997)9月19日

(71)出願人 591038141

寶酒造株式会社

京都府京都市伏見区竹中町609番地

(72)発明者 岸田 小百合

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造
株式会社中央研究所内

(72)発明者 碓井 圭名子

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造
株式会社中央研究所内

(72)発明者 島田 敦

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造
株式会社中央研究所内

(74)代理人 弁理士 中本 宏 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 RNA量の測定方法並びに測定キット

(57)【要約】

【課題】 簡便で操作性、再現性に優れ、かつ高感度な、PCR法を利用したRNAの定量手段を提供する。

【解決手段】 RNAに相補的なcDNAの合成、並びに該cDNAを鋳型としたPCRを用いてRNA量を測定するとき、当該cDNAの合成、並びにPCRを、RNA又はcDNA競合物の存在下に一つの反応容器中で連続して行うRNA量の測定方法。逆転写活性を有する酵素、耐熱性DNAポリメラーゼ、4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸、少なくとも1対のプライマー対、RNA又はcDNA競合物、リボヌクレアーゼ阻害剤を含有する、上記RNA量の測定方法に使用される反応液。該反応液を含有するRNA量の測定キット。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 RNAに相補的なcDNAの合成、並びに該cDNAを鋳型としたポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)を用いてRNA量を測定する方法において、当該cDNAの合成、並びにPCRを、RNA又はcDNA競合物の存在下に一つの反応容器中で連続して行うことを特徴とするRNA量の測定方法。

【請求項2】 PCRを、少なくとも1対のプライマー対を使用した2段階のPCRによって行うことを特徴とする請求項1記載のRNA量の測定方法。

【請求項3】 PCRを、校正活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼと、校正活性を有さない耐熱性DNAポリメラーゼとの混合物によって実施することを特徴とする請求項1あるいは2記載のRNA量の測定方法。

【請求項4】 WT1 mRNA、 β -アクチン mRNA、サイトケラチン mRNA、Flt3 mRNA、bcr/abl mRNA、pml/rara mRNA、aml1/mtg8 mRNA、e2a/pbx1 mRNAから選択されるmRNAを測定対象とする請求項1～3のいずれか1項に記載のRNA量の測定方法。

【請求項5】 逆転写活性を有する酵素、耐熱性DNAポリメラーゼ、4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸、少なくとも1対のプライマー対、RNA又はcDNA競合物、リボヌクレアーゼ阻害剤を含有する、請求項1～3のいずれか1項に記載のRNA量の測定方法に使用される反応液。

【請求項6】 WT1 mRNA、 β -アクチン mRNA、サイトケラチン mRNA、Flt3 mRNA、bcr/abl mRNA、pml/rara mRNA、aml1/mtg8 mRNA、e2a/pbx1 mRNAから選択されるmRNAを測定対象とする請求項5記載の反応液。

【請求項7】 請求項5あるいは6記載の反応液の1反応分の必要量が分注されている反応容器。

【請求項8】 請求項5又は6記載の反応液、あるいは請求項7記載の反応容器を含有することを特徴とするRNA量の測定キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生体由来試料中に存在する微量のRNAの定量を迅速、簡便、高感度に、かつコンタミネーションの危険なく行うための方法、並びに該方法に使用する試薬キットに関する。

【0002】

【従来の技術】今日、遺伝子増幅法は微量な核酸を検出するための必須の技術として広範な分野で用いられており、特に臨床診断の分野で著しい。そのような遺伝子増幅法の代表例はポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)法として広く知られている。現在、その利用

分野はRNA、特にmRNAの定量においても活発に利用されるようになってきた。RNAの定量に通常使用される競合RT-PCR法は、RNA競合物の共存下でRNAに逆転写酵素を作用させてcDNAを作製する反応、更に目的遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCRによってcDNAを増幅する反応、という2工程を経て行われている。また、この変法として、RNAに逆転写酵素を作用させてcDNAを作製する反応、更にこのcDNAにcDNA競合物を添加してのPCR、という2工程からなるものがある。更に、高感度な検出を目的として、上記方法のPCRの工程を2回行う、いわゆるネステッドPCR法という方法も取入れられてきた。しかし、これらの古典的なRNA定量法には、いくつかの問題があった。例えば、上記の各工程ごとに反応液を移し変えなければならず、この操作は反応液の調製も含めて繁雑でかつ時間を要し、クロスコンタミネーションを引起す原因となっていた。特にPCR工程にネステッドPCR法を用いた場合には全体として3工程となり、ますます上記問題は顕著になる。PCR法が広く応用される今日に至ってもこれらの問題を解決する技術は発表されていない。なお、RNAからのcDNA合成、並びにPCR反応を1つの反応容器で行う方法は既にバイオテクニクス(BioTechniques)、第18巻、第678～687頁(1995)に報告されているが、これは競合RT-PCRではなく、RNAの定量を可能にしたものではなかった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、PCR法を利用したRNAの定量法に関する上記の問題点を克服し、簡便で操作性、再現性に優れ、かつ高感度なRNAの定量手段を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明を概説すれば、本発明の第1の発明はRNA量の測定方法に関し、RNAに相補的なcDNAの合成、並びに該cDNAを鋳型としたPCRを用いてRNA量を測定する方法において、当該cDNAの合成、並びにPCRを、RNA又はcDNA競合物の存在下に一つの反応容器中で連続して行うことを特徴とする。本発明の第2の発明は第1の発明のRNA測定方法に使用される反応液に関し、逆転写活性を有する酵素、耐熱性DNAポリメラーゼ、4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸、少なくとも1対のプライマー対、RNA又はcDNA競合物、リボヌクレアーゼ阻害剤を含有することを特徴とする。更に、本発明の第3の発明はRNA量の測定キットに関し、第2の発明の反応液、又は該反応液が分注された反応容器を含有することを特徴とする。

【0005】本発明者らは鋭意研究を重ね、驚くべきことにある条件下ではこれらの複数の分断された工程を連続した1工程で、しかも1つの反応容器の中で実施可能

であることを発見し、上記問題点を解決し、高感度、迅速、簡便にクロスコンタミネーションの危険性なく行う、連続競合RT-PCR (CCRP) 法、並びに該方法に使用する試薬キットを開発し、本発明を完成するに至った。

【0006】

【発明の実施の形態】以下、本発明を具体的に説明する。本発明の方法を適用することができる試料には特に限定はないが、例えば細胞、組織、血液、喀痰、糞便、尿のような生体試料、食品、土壌、排水のような生物を含有する可能性のある試料から公知の方法で処理することで得られる全RNA、あるいは特定のRNA分子、例えばmRNAを富化した試料等が本発明に使用できる。RNA試料は水溶液、あるいは適切な固相に吸着又は固定化した状態で用いられる。全RNA量としては反応液100 μ l当たり0.01ng~1 μ gが適している。

【0007】本発明において連続競合RT-PCR (CCRP) 法に使用される反応用緩衝液としては、逆転写活性を有する酵素、並びにDNAポリメラーゼが活性を示すのに適した水溶性緩衝液であればよく、例えばpH7~10のトリス緩衝液が挙げられ、好ましくはpH8~9のものが良い。更にこの緩衝液の中には逆転写活性を有する酵素並びにDNAポリメラーゼの活性に必要な種々のイオンを含む。中でもNa、Kイオンは塩の形で5~50mMの濃度で添加される。Mgイオンは塩の形で1~10mMで添加される。その他、必要に応じて界面活性剤、ウシ血清アルブミン (BSA)、ゼラチン等、逆転写活性を有する酵素並びにDNAポリメラーゼの活性を促進、安定化する薬剤が添加される。また、試料中のRNA及びRNA競合物の分解を抑制するためにリボヌクレアーゼ阻害剤が添加されていてもよい。

【0008】逆転写活性を有する酵素としてはトリ骨芽球症ウイルス由来逆転写酵素 (AMV)、ラウス関連ウイルス由来逆転写酵素 (RAV2)、モロニー・ネズミ白血病ウイルス由来逆転写酵素 (MMLV)、サーマス・サーモフィルス (*Thermophilus*) 由来DNAポリメラーゼ (Tth)、バチルス・カルドテナクス (*Bacillus cardotenax*) 由来DNAポリメラーゼ (Bca)、並びにそれらの誘導体が挙げられるが、中でもAMVが最も本発明に適している。なお、これらの酵素はその本来の起源より精製して取得されたもの、あるいは遺伝子工学的に生産された組み換え蛋白質のいずれであってもよい。

【0009】PCR法に用いる耐熱性DNAポリメラーゼとしては、種々の耐熱性DNAポリメラーゼ、例えばサーマス・アクアティクス (*Thermus aquaticus*) 由来DNAポリメラーゼ (Taq)、上記のTth、ピロコッカス・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) 由来DNAポリメラーゼ (Pfu)、ピロコッカス・ボウゼイ (*Pyrococcus wosei*) 由来DNAポリメラーゼ (Pw

o)、ピロコッカス KOD1株 (*Pyrococcus* sp. strain KOD1) 由来DNAポリメラーゼ (KOD)、クレンタックDNAポリメラーゼ (KlenTaq) 等が使用できる。これらの酵素はその本来の起源より精製して取得されたもの、あるいは遺伝子工学的に生産された組換え蛋白質のいずれであってもよく、またその活性を失わない範囲で適当な修飾がなされた誘導体酵素であってもよい。

【0010】本発明では、好ましくは校正活性、すなわち3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼと校正活性を持たない耐熱性DNAポリメラーゼとを混合して使用される。校正活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼとしてはPfu、Pwo、KOD等が挙げられるが、中でもPfuが最も適している。校正活性を持たない耐熱性DNAポリメラーゼとしてはTaq、KlenTaq等が挙げられるが、中でもTaqが最も適している。これらの酵素を混合して使用することにより、PCRの効率、例えば増幅効率を向上させることができる。

【0011】本発明のRNAの定量方法では逆転写活性を有する酵素と耐熱性DNAポリメラーゼの両方を含む反応液が使用される。逆転写活性を有する酵素は反応液に十分量添加されなければならない、DNAポリメラーゼと同等又はより過剰である必要がある。具体的には100 μ lの反応系で5~200Uが適しており、特にAMVでは5~50Uが適している。また、DNAポリメラーゼとの比率は1:1~5:1、さらに好ましくは2:1~4:1が適している。また、本発明では逆転写活性を有する酵素、校正活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼ、校正活性を有しない耐熱性DNAポリメラーゼの3種を含む反応液も使用される。逆転写活性を有する酵素としてAMV、校正活性を有するDNAポリメラーゼとしてPfu、校正活性を有しないDNAポリメラーゼとしてTaqをそれぞれ使用する場合、特に限定するものではないが、各々の活性比率としてAMV、Pfu、Taqを2:1:6の割合で含む反応液が特に本発明に好適である。

【0012】反応液にはcDNA合成並びにPCRにおいて基質となる4種のデオキシヌクレオチド三リン酸 (dATP、dCTP、dGTP、dTTP; 本明細書ではこの4種を総称してdNTPと記載する) が添加される。また、dNTPはそのすべて、又は一部が、プライマーから合成されるDNA鎖の伸長を可能とする範囲で修飾及び/又は標識されたdNTPに置き換えることもできる。

【0013】本発明において標的RNAからのcDNA合成に用いられるプライマーとしては、例えば標的RNAに相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドがあり、使用される反応条件において標的RNAに対してアニールするものであれば特に限定されるものではない。

長さは、6～100ヌクレオチド、好ましくは10～30ヌクレオチドの長さのものが使用される。また修飾及び／又は標識されたプライマーも使用できる。該プライマーは、例えば公知方法により化学的に合成することができる。また、PCRにおいて使用されるプライマーも、標的RNA由来のcDNAを鋳型としたDNAの増幅が可能であれば特に限定はない。上記の標的RNAからのcDNA合成に使用されるプライマーをDNAの増幅反応に使用しても差支えない。

【0014】本発明において使用されるRNA競合物並びにcDNA競合物は公知の方法で作製することができる。例えば、*プロシーディングズ オブ ザ ナショナルアカデミー オブ サイエンス オブ ザ USA* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第87巻、第2725～2729頁(1990)、*クリニカル ケミストリー* (Clin. Chem.)、第41巻、第819～825頁(1995)、*ブラッド* (Blood)、第82巻、第1929～1936頁(1993)等に記載の方法がある。これら競合物は標的RNA由来の塩基配列を有していてもよく、またこれとは全く関係ない塩基配列、例えばγグロビン遺伝子の塩基配列から作製されてもよい。また、競合物はその増幅産物が標的RNA由来のものと区別できるよう、標的RNAとは異なる鎖長の増幅産物を与えるように設計すべきである。両者の差は適切な分析方法、分析機器によって明確に区別できるものであればよく、通常の電気泳動法では10～200bpの差が用いられる。好ましくは競合物由来の増幅産物の鎖長が標的RNA由来のものの75～125%の範囲であればよい。

【0015】上記の競合物はその既知量を試料と共に反応液中に添加し、逆転写反応、PCRを実施して使用される。この際、通常は試料あるいは競合物を数段階に希釈して使用し、できるだけこの両者からの増幅産物量が近い反応を観察できるようにする。反応終了後、反応液中に生成した標的RNA並びに競合物由来の増幅産物量を比較し、競合物由来増幅産物に対する標的RNA由来増幅産物の割合と添加された競合物の量とを基に試料中の標的RNA量を知ることができる。例えば両増幅産物の量比が1:1である場合には標的RNAの量は添加された競合物の量に等しい。増幅産物量は、例えば通常の電気泳動法によって測定することができる。例えばアガロースゲル電気泳動によって増幅産物量を測定する場合には、泳動後のゲルを適当な核酸染色試薬、例えばエチジウムブロマイド等で染色した後にゲルの写真を撮るか、又は適当な画像解析装置を使用して泳動結果を解析すればよい。

【0016】以下、本発明による競合連続RT-PCR (CCRP)の反応条件を以下に示す。反応容器内にdNTP、Mg塩、リボヌクレアーゼ阻害剤、逆転写活性を有する酵素、耐熱性DNAポリメラーゼ、RNA又はcDNA競合物、プライマー等を含む反応液を加え反応

開始までは4℃以下で保冷しておく。これに測定しようとする試料を添加し45～70℃、好ましくは50～60℃で5～30分、好ましくは10～20分反応させcDNA合成を行う。引続き90～99℃で1～2分保温し、RNA-cDNA複合体を変性させる。更に90～99℃の変性反応、45～65℃のアニーリング反応、60～80℃のDNA伸長反応からなる温度サイクル反応を2～50サイクル行つて標的RNA由来のDNA断片を増幅する。更に感度及び／又は特異性を向上するためにネステッドPCRを行う場合には、1段階目、2段階目のPCRに使用するプライマーを共に最初から反応容器内に添加しておき、2段階のPCRを連続して行うこともできる。この場合1段階目のPCR用プライマー量は2段階目のPCR用プライマー量より少なくすることが必要で、好ましくは100倍以下の量が適している。

【0017】本発明の方法によりその量を測定される標的RNAには何ら制限はなく、適当なプライマーを作製可能な任意のRNA、すなわちその塩基配列若しくはそのcDNAの塩基配列、あるいはこれらの一部が既知であるRNAの定量を行うことができる。mRNAを標的とした場合には、用いた試料中での該mRNAにコードされるタンパクの発現量を知ることができる。また、例えば該タンパクの発現量の変動が特定の疾病への罹患を示唆するものであった場合には、本発明の方法をその診断に利用することもできる。また、本発明の方法により、ウイルスの測定を行うことができる。対象となるウイルスには特に限定はなく、例えばDNAウイルスの場合にはゲノムDNAから転写されたRNAを、また、RNAウイルスの場合にはゲノムRNA自体を標的として試料中に存在するウイルスの量を知ることができる。例えばヒトC型肝炎ウイルス(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)などが検出対象として挙げられる。

【0018】本発明の方法によりその発現量を測定される標的RNA、特にヒトのmRNAとしては、例えばWT1 mRNA、β-アクチン mRNA、サイトケラチンmRNA、Flt3 mRNA、bcr/abl mRNA、pml/rara mRNA、aml1/mtg8 mRNA、e2a/pbx1 mRNA等が挙げられる。これらのmRNAの塩基配列に関する情報は、それぞれ下記の報文に記載されている。WT1: *プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス オブ ザ USA*、第88巻、第9618～9622頁(1991)。β-アクチン: *ヌクレイック アシッズ リサーチ* (Nucl. Acids Res.)、第12巻、第1687～1696頁(1984)。サイトケラチン19: *ヌクレイックアシッズ リサーチ*、第15巻、第10058頁(1987)。サイトケラチン20: *ディフェレンティエーション* (Differentiation)、第53巻、第95～104頁(1993)。Flt3: *ブラッド*、第82巻、第1110～1119頁(1

993)。bcr/abl (ALL型)：プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ USA、第83巻、第9768～9772頁(1986)。bcr/abl (CML型)：モレキュラー アンド セルラー バイオロジー (Mol. Cell. Biol.)、第6巻、第607～616頁(1986)、セル (Cell)、第47巻、第277～284頁(1986)。pml/rarα：セル、第66巻、第663～674頁(1991)。aml1/mtg8：ジ エンボ ジャーナル (The EMBO Journal)、第12巻、第2715～2721頁(1993)。e2a/pbx1：セル、第60巻、第535～545頁(1990)。

【0019】上記のような本発明の方法によるRNA量の定量に使用される反応液、すなわち逆転写反応とPCRの2つの酵素反応に必要な各種成分(dNTP、Mg塩、pH調整のための緩衝成分等)、逆転写活性を有する酵素、耐熱性DNAポリメラーゼ、上記の2反応に使用されるプライマー、RNA又はcDNA競合物をすべて含有する反応液を作製することができる。更に酵素を安定化するような成分やリボヌクレアーゼ阻害剤等が添加されたものであってもよい。該反応液はその必要量を適当な反応容器にとり、測定しようとする試料を添加するだけで反応を開始することができるため、RNA量の測定を非常に簡便に行うことができ、特に多数の試料を扱う場合に有用である。また、あらかじめ該反応液の1回分の必要量が分注された反応容器を準備しておくことにより、更に操作効率を改善することができる。本発明のキットは上記の方法に従ってRNAの定量を簡便、迅速に、かつクロスコンタミネーションの問題なく行えるキットである。該キットとしては、例えば上記方法に使用する各種試薬を含有するキット、上記の本発明に使用される反応液を含有するキット、該反応液の1回分が分注された反応容器を含有するキット等が挙げられる。該キットは特に種々の検査、中でも臨床診断用キットとして有用であり、白血病の検査、固型がんの微小転移の検査、残存微小病変の検査、感染症の検査などに広く利用できる。

【0020】

【実施例】以下、本発明を実施例をもって更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0021】実施例1 WT1 mRNAの定量測定

(1) RNA競合物の作製

ヒト白血病細胞であるK-562細胞(ATCC CCL-243)よりTrizol試薬(ギブコBRL社製)を用いて全RNAを調製した。次に、この全RNAを鋳型とし、RNA PCRキット(AMV) Ver. 2.1 (宝酒造社製)を使用したRT-PCRによってWT1 cDNAを調製した。RT-PCRにはWT1-F1、WT1-R1(配列表の配列番号1、2にそれぞれプライマー WT1-F1、WT1-R1の塩基配

列を示す。)の2つのプライマーを使用した。これによって鎖長287bpのWT1 cDNAが得られた。上記のWT1 cDNAを鋳型としたPCRを行い、その塩基配列の一部を欠損した欠損cDNAを作製した。なお、PCRにはPCRアンプリフィケーションキット(宝酒造社製)、上記のプライマー WT1-F1及びプライマー WT-Comp2(配列表の配列番号3にプライマー WT-Comp2の塩基配列を示す)を使用した。これによって鎖長253bpの欠損WT1 cDNAが得られた。次に、この欠損WT1 cDNAを用いてRNA競合物を作製した。まず、pT7BlueT ベクターキット(ノバジェン社製)を使用したTAクローニング法により、該欠損cDNAのサブクローニングを行い、プラスミドpT7BlueWT1Δ1を作製した。該プラスミドをBamHI(宝酒造社製)で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、Suprec-01(宝酒造社製)を用いて3140bpの直鎖DNA(7×10¹¹コピー/μl)をゲルより回収した。得られた直鎖DNAはcDNA競合物としてWT1 mRNAの定量に使用することができる。更にこの直鎖DNAを鋳型とし、ラージスケール T7トランスクリプションキット(ノバジェン社製)を使用したイン・ビトロ転写反応を行い、RNA競合物を作製した。得られたRNA競合物(WT1 cRNA)を260nmの吸光度により定量したところ、その濃度は7×10¹²コピー/μlであった。

【0022】(2) 連続競合RT-ネステッドPCR法によるWT1 mRNAの定量

上記のK-562細胞由来全RNAを試料として、以下に示す操作でWT1 mRNAの定量を行った。以下の成分を含む反応液を調製した：50mMのトリス-塩酸(pH9.2、25℃)、1mMのMgCl₂、10mMのKCl、14mMの(NH₄)₂SO₄、各1mMのdNTP、各0.4nMのプライマーWT1-F1及びWT1-R1、各400nMのプライマーC及びプライマーD(配列表の配列番号4、5にそれぞれプライマー C及びプライマーDの塩基配列を示す。)、10Uのリボヌクレアーゼ阻害剤(宝酒造社製)、24UのAMV逆転写酵素(宝酒造社製)、1UのPfu DNAポリメラーゼ(ストラタジーン社製)、6UのTaq DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)、10⁶コピーの上記のRNA競合物、上記のK-562細胞由来全RNA。なお、上記のK-562細胞由来全RNAは0.01ng、0.1ng、1ng、10ng、100ng、1000ngの6種のRNA量で反応液に添加した。調製した反応液を下記①～④の条件で順次反応させた：

- ① 54℃、15分、
- ② 94℃、90秒、
- ③ 94℃、15秒～54℃、30秒～72℃、30秒を1サイクルとする10サイクル反応、
- ④ 94℃、15秒～50℃、30秒～72℃、30秒

を1サイクルとする35サイクル反応。

【0023】反応終了後、反応液をアガロースゲル電気泳動に供した。泳動後のゲルをエチジウムブロマイド染色の後に蛍光イメージアナライザーFMBIOIIマルチビュー（宝酒造社製）を用いて解析することにより、標的mRNA及びRNA競合物由来の増幅産物量を比較し、試料中の標的mRNA（WT1 mRNA）量を求めた。結果を図1に示す。図1は同一の試料を使用して異なる日時に行った4回の測定の結果を示す。図中□、◇、○、△はそれぞれ同じ日時の測定結果を示し、●はそれらの平均を示す。また図1中横軸は反応液に添加された全RNA量（ng）、縦軸は反応液中に検出されたWT1 mRNAのコピー数を示す。図1に示されるように、添加された全RNA量と測定された標的mRNA量は良好な直線関係を示し、また、各測定日時毎の測定結果の変動（日差変動）も見られず、本発明の方法が安定した測定法であることが示された。また、今回の測定に要した時間は、各工程を独立して行う従来法に比べて約

1/4に短縮された。

【0024】（3）添加回収試験

上記のK-562細胞由来全RNAを種々の比率で健康人末梢血由来の全RNAと混合したものを試料として、上記の方法によりWT1 mRNA量の測定を行った。末梢血からの全RNAの調製にはTriZol試薬を用いた。この結果、測定値は試料中に添加されたK-562細胞由来全RNAの量とよく一致しており、本測定方法が十分な添加回収性を有していることが示された。

【0025】実施例2 連続競合RT-PCR法を利用したβ-アクチン mRNA定量用反応液の作製
容量200μlのPCR用チューブに、下記表1の成分を含む25μlのβ-アクチン mRNA定量用反応液を調製した。この反応液は-20℃以下で安定に保存された。なお、プライマー AC-F1、BA-R1の塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号6、7に示す。

【0026】

【表1】

1

AMV逆転写酵素	: 2.5U
Taq DNAポリメラーゼ	: 2.5U
プライマー AC-F1	: 5pmol
プライマー BA-R1	: 5pmol
リボヌクレアーゼ阻害剤	: 20U
β-アクチンcDNA競合物（ヒトβ-アクチン コンペティティブPCRセット、宝酒造社製）	: 1×10 ⁵ コピー
トリス塩酸（pH9.2、25℃）	: 終濃度50mM
MgCl ₂	: 終濃度5mM
KCl	: 終濃度10mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	: 終濃度14mM
ウシ血清アルブミン（BSA）	: 終濃度0.01%
dNTP	: 各1mM

【0027】U-937細胞（ATCC CRL-1593）よりTriZol試薬を用いて調製した全RNAを0.03~100ng/μlの範囲で段階希釈した。これらの1μlずつをそれぞれ上記の反応液に添加し、これを下記①~③の条件で順次反応させた；

① 45℃、15分、

② 94℃、90秒、

③ 94℃、15秒~54℃、30秒~72℃、30秒を1サイクルとする30サイクル反応、

【0028】反応終了後、反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、実施例1同様の操作で増幅産物の定量を行った。測定結果を図2に示す。図2中横軸は反応液に添加された全RNA量（ng）、縦軸は標的RNA由来増幅産物量の競合物由来増幅産物量に対する割合（T/C比）を示す。図2に示されるように、添加された全RNA量と測定されたT/C比は良好な直線関係を示し、上

記の反応液を使用することによってβ-アクチン mRNA量を簡便、かつ正確に定量できることが示された。

【0029】実施例3 種々のヒトmRNA測定キットの作製

実施例1記載のヒトWT1 mRNA定量で使用された反応液の組成を参考に、本発明の方法によって下記表2記載のヒトmRNA量を測定するためのキットを作製した。各キット共AMV逆転写酵素、Pfu DNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼの3種の酵素を含むものとし、表2記載の各プライマー、並びに該プライマーと各標的mRNA塩基配列とから実施例1記載の方法で作製された競合物とをそれぞれのキットに添付した。各mRNAの測定に使用されるプライマーを表2に示す。なお、表2中に4種のプライマーを示したものは、それぞれ1組のプライマー対を使用する2段階のPCR（ネステッドPCR）を行うものである。また、3

種のプライマーを示したものは1つのプライマーがその両方に共通して使用される2段階のPCRを行うものである。

【0030】

【表2】

標的mRNA	プライマー、及び配列表中の配列番号
サイトケラチン19	CK19-F2 (配列番号9)
	CK19-R1 (配列番号10)
	CK19-R2 (配列番号11)
サイトケラチン20	CK20-F1 (配列番号12)
	CK20-R1 (配列番号13)
	CK20-R2 (配列番号14)
Flt3	Flt3-F1 (配列番号15)
	Flt3-F2 (配列番号16)
bcl/abl (CML型)	ba-F1 (配列番号17)
	ba-F2 (配列番号18)
	ba-R1 (配列番号19)
bcl/abl (ALL型)	ba-F3 (配列番号20)
	ba-F4 (配列番号21)
	ba-R3 (配列番号22)
	ba-R4 (配列番号23)
pml/rara	pr-F1 (配列番号24)
	pr-F2 (配列番号25)
	pr-R1 (配列番号26)
aml/mtg8	pr-R2 (配列番号27)
	am-F1 (配列番号28)
	am-F2 (配列番号29)
	am-R1 (配列番号30)
e2a/pbx	am-R2 (配列番号31)
	ep-F1 (配列番号32)
	ep-F2 (配列番号33)
	ep-R1 (配列番号34)
	ep-R2 (配列番号35)

【0031】

【発明の効果】本発明により、従来技術では非常に複雑で、時間を要していたRNAの高感度定量を簡便、迅速に行うことが可能になる。更に、これまでは各工程ごとの反応液の移し換えの際に問題となったピペッティングの誤差やコンタミネーションの危険もなく正確、かつ再現性の高い測定を行うことができる。

【0032】

配列：

ACAGATGCAC AGCAGGAAGC

20

【0034】配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列：

TGATGGCGGA CTAATTCATC

20

【0035】配列番号：3

配列の長さ：62

配列の型：核酸

【配列表】

【0033】配列番号：1

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列:	
TGTGATGGCG GACTAATTCA TCAACTTTT CTGACAACTT GGACTTGTTT TACCTGTATG	60
AG	62
【0036】配列番号: 4	鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 20	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
配列:	
AGCAGGAAGC AACTGGTGA	20
【0037】配列番号: 5	鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 20	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
配列:	
AACTTTTCT GACAACTTGG	20
【0038】配列番号: 6	鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 21	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
配列:	
CAAGAGATGG CCACGGCTGC T	21
【0039】配列番号: 7	鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 21	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
配列:	
TCCTTCTGCA TCCTGTCGGC A	21
【0040】配列番号: 8	鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 21	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
配列:	
GCGGGCAACG AGAAGCTAAC C	21
【0041】配列番号: 9	鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 21	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
配列:	
ATGCAGAACC TCAACGACCG C	21
【0042】配列番号: 10	鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 21	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
配列:	
TCTGCATCTC CAGGTCGGTC C	21
【0043】配列番号: 11	鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 21	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
配列:	
CAGTGCCTGT TCCGTCTCAA A	21
【0044】配列番号: 12	鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 21	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
配列:	
CAGACACACG GTGAACATATG G	21
【0045】配列番号: 13	配列の型: 核酸
配列の長さ: 22	鎖の数: 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

GATCAGCTTC CACTGTTAGA CG

【0046】配列番号：14

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

AAGTCCTCAG CAGCCAGTTT A

【0047】配列番号：15

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

TGTCGAGCAG TACTCTAAAC A

【0048】配列番号：16

配列の長さ：22

配列の型：核酸

配列：

ATCCTAGTAC CTCCCAAAC TC

【0049】配列番号：17

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列：

AGATGCTGAC CAACTCGTGT

【0050】配列番号：18

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列：

TTCGCCTGAC CATCAATAAG

【0051】配列番号：19

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列：

GCCACAAAT CATACAGTGC

【0052】配列番号：20

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

TGGCCCCGCA GGTCTACTC C

【0053】配列番号：21

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

GCACTGCCCC GTTGTCGTGT C

【0054】配列番号：22

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列：

CATACAGTGC AACGAAAGGT

【0055】配列番号：23

配列の長さ：21

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

22

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

22

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

CTGGGTCCAG CGAGAAGGTT T

【0056】配列番号：24

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

CCCCAGAGCC TGCAAGCTGC C

【0057】配列番号：25

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

TGGCTTCGAC GAGTTC AAGG T

【0058】配列番号：26

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列：

CATAGTGGTA GCCTGAGGAC

【0059】配列番号：27

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

CTGGGCACTA TCTCTCAGA A

【0060】配列番号：28

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

GGCAATGATG AAAACTACTC G

【0061】配列番号：29

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

CGAAGTGGAA GAGGGAAAAG C

【0062】配列番号：30

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

TCCTATCTCG GGTGAAATGT C

【0063】配列番号：31

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

GGGGAGGTGG CATGTTGGA G

【0064】配列番号：32

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

GGGCTGGCCT CAGGTTTCAC C

【0065】配列番号：33

配列の長さ：21

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

GGAGGCAGCC ACCCCGAGGA C

【0066】配列番号：34

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

CGACCCTCCG CCCTTCTCAG G

【0067】配列番号：35

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

GCCACGCCCTT CCGCTAACAG C

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明方法によるWT1 mRNAの定量の結果を、添加全RNA量とWT1 mRNAのコピー数と関

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

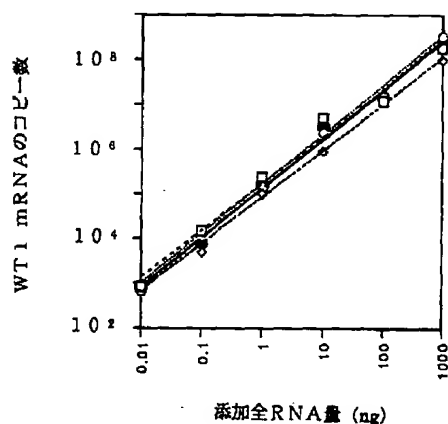
配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

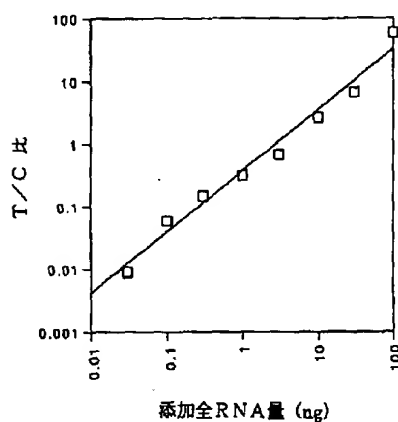
係で示したグラフである。

【図2】本発明方法による β -アクチン mRNAの定量の結果を、添加全RNA量とT/C比との関係で示したグラフである。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 日野 文嗣

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 資酒造
株式会社中央研究所内

(72)発明者 加藤 郁之進

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 資酒造
株式会社中央研究所内

L6 ANSWER 1 OF 1 HCAPLUS COPYRIGHT 2003 ACS

AN 1999:224280 HCAPLUS Full-text

DN 130:307516

TI Determination of RNA by PCR in the presence of RNA or cDNA competitors
IN Kishida, Sayuri; Usui, Kanako; Shimada, Atsushi; Hino, Fumitsugu; Kato, Ikunoshin

PA Takara Shuzo Co., Ltd., Japan

SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 11 pp.

CODEN: JKXXAF

DT Patent

LA Japanese

IC ICM C12Q001-68

ICS C12N015-09

CC 3-1 (Biochemical Genetics)

FAN.CNT 1

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
-----	----	-----	-----	-----

PI	JP 11089596	A2	19990406	JP 1997-271993	19970919 <--
----	-------------	----	----------	----------------	--------------

PRAI	JP 1997-271993		19970919		
------	----------------	--	----------	--	--

AB Described is a method for the determination of RNA with improved sensitivity and reproducibility. The method comprises synthesis of cDNA and amplification of the cDNA in the presence of RNA or cDNA competitors. The method also requires a reverse transcriptase, heat-resistant DNA polymerase, NTPs and RNase inhibitors. Methods and kits for the determination of mRNA from gene WT1, β -actin, cytokeratin, Flt3, bcr/abl, pml/rara, aml1/mtg8, or e2a/pbx1 are claimed.

ST mRNA detn method kit cDNA RNA competitor

IT Gene, animal

RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)

(BCR; determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT Gene, animal

RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)

(E2A; determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT Gene, animal

RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)

(Flt3; determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT Gene, animal

RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)

(RARA; determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT Gene, animal

RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)

(WT1; determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT Gene, animal

RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)

(aml1; determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT Gene, animal

RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)

(c-abl; determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT PCR (polymerase chain reaction)

(determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT mRNA

RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)

(determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT RNA

RL: BUU (Biological use, unclassified); BIOL (Biological study); USES

(Uses)

(determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT cDNA
 RL: BUU (Biological use, unclassified); BIOL (Biological study); USES (Uses)
 (determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT Gene
 (expression; determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT Keratins
 RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)
 (gene for; determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT Gene, animal
 RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)
 (mtg8; determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT Gene, animal
 RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)
 (pbx1; determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT Gene, animal
 RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)
 (pml; determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT Actins
 RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)
 (β -, gene for; determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT 9068-38-6, Reverse transcriptase
 RL: ARG (Analytical reagent use); ANST (Analytical study); USES (Uses)
 (determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT 9012-90-2, DNA polymerase
 RL: ARG (Analytical reagent use); ANST (Analytical study); USES (Uses)
 (heat-resistant; determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

IT 9001-99-4, RNase
 RL: ARU (Analytical role, unclassified); ANST (Analytical study)
 (inhibitors; determination of RNA by PCR in presence of RNA or cDNA competitors)

